

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year) 14 March 2002 (14.03.02)	From the INTERNATIONAL BUREAU To: AOYAMA, Tamotsu Aoyama & Partners IMP Building, 3-7, Shiromi 1-chome Chuo-ku Osaka-shi, Osaka 540-0001 JAPON		
Applicant's or agent's file reference 662636	IMPORTANT NOTIFICATION		
International application No. PCT/JP01/06209	International filing date (day/month/year) 18 July 2001 (18.07.01)		

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input checked="" type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative				
Name and Address KOYANAGI, Satoru c/o JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE 6-1, Okubo 1-chome Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8568 Japan		State of Nationality JP		State of Residence JP
		Telephone No.		
		Facsimile No.		
		Teleprinter No.		
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input checked="" type="checkbox"/> the name <input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence				
Name and Address KOYANAGI, Satoshi c/o JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE 6-1, Okubo 1-chome Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8568 Japan		State of Nationality JP		State of Residence JP
		Telephone No.		
		Facsimile No.		
		Teleprinter No.		
3. Further observations, if necessary:				
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:				
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35		Authorized officer Susumu KUBO Telephone No.: (41-22) 338.83.38		

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)



From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

AOYAMA, Tamotsu
 Aoyama & Partners
 IMP Building, 3-7, Shiromi 1-chome
 Chuo-ku
 Osaka-shi, Osaka 540-0001
 JAPON

Date of mailing (day/month/year) 19 October 2001 (19.10.01)	
Applicant's or agent's file reference 662636	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP01/06209	International filing date (day/month/year) 18 July 2001 (18.07.01)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 21 July 2000 (21.07.00)
Applicant JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
21 July 2000 (21.07.00)	2000-220600	JP	10 Sept 2001 (10.09.01)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Peggy Steunenberg Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

Date of mailing (day/month/year)

31 January 2002 (31.01.02)

To:

AOYAMA, Tamotsu
Aoyama & Partners
IMP Building, 3-7, Shiromi 1-chome
Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-0001
JAPON



Applicant's or agent's file reference

662636

IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/JP01/06209

International filing date (day/month/year)

18 July 2001 (18.07.01)

Priority date (day/month/year)

21 July 2000 (21.07.00)

Applicant

JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH
INSTITUTE et al

- Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:
KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

- The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE,AG,AL,AM,AP,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EA,EC,
EE,EP,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,
MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

- Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
31 January 2002 (31.01.02) under No. WO 02/08249

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and the PCT Applicant's Guide, Volume II.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

J. Zahra

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Telephone No. (41-22) 338.91.11

特許協力条約

E P · U S

P C T

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 662636	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP01/06209	国際出願日 (日.月.年) 18.07.01	優先日 (日.月.年) 21.07.00
出願人(氏名又は名称) 財団法人化学及血清療法研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表

この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の單一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものと承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は 出願人が提出したものと承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。

第一欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第二欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1 – 3 5 に共通の事項は、カルシウムイオン結合性タンパク質を含有する試料をカルシウムイオン存在下で陽イオン交換担体に接触させてカルシウムイオン結合性タンパク質を吸着させて精製することである。しかしながら、調査の結果、上記共通事項は文献 EP 71166 A2 (TONEN CORP) 11. 9月, 1996 (11. 09. 96) に開示されているから、新規でないことが明らかとなった。

よって、この共通事項は先行技術の域を出るものではないから、PCT 規則 13. 2 における特別な技術事項であるとはいえない。それ故に請求の範囲の全てに共通の特別な技術事項はなく、上記発明群が單一の一般的な発明概念を形成するように関連している一群の発明であるとは認められない。

しかし、追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C07K1/18, C07K2/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C07K1/18, C07K2/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICST(JOIS), MEDLINE(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	EP 731166 A2 (TONEN CORP) 11.9月.1996 (11.09.96) & JP 8-238090 A & JP 8-238091 A & US 5976832 A P. 10 Example:2 参照	1-15, <u>17-20, 23-35</u> 16, 21, 22
X Y	US 5258497 A (BOEHRINGER INGELHEIM INT GMBH) 2.11月.1993 (02.11.93) & EP 409053 A & JP 3-175992 A & DE 4021979 A & CA 2021147 A	<u>1-35</u> 16, 21, 22
X Y	Cliff ROSS, et. al., Isolation of parvalbumin isotypes by preparative HPLC techniques., PREP. BIOCHEM. & BIOTECHNOL., (1998), Vol. 28, No. 1, p. 49-60	1-15, <u>17-20, 23-35</u> 16, 21, 22

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 24. 10. 01	国際調査報告の発送日 13.11.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 新見 浩一 印

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2002年1月31日 (31.01.2002)

PCT

(10)国際公開番号
WO 02/08249 A1

- (51)国際特許分類: C07K 1/18, 2/00 (72)発明者; および
PCT/JP01/06209 (75)発明者/出願人(米国についてのみ): 溝上 寛 (MI-
ZOKAMI, Hiroshi) [JP/JP]. 古川真一 (FURUKAWA,
Shinichi) [JP/JP]. 菅原敬信 (SUGAWARA, Keishin)
[JP/JP]. 恩智達文 (ONCHI, Tatsufumi) [JP/JP]. 小
松一浩 (KOMATSU, Kazuhiro) [JP/JP]. 小柳 智
(KOYANAGI, Satoru) [JP/JP]; 〒860-8568 熊本県熊
本市大窪一丁目6番1号 財団法人 化学及血清療法
研究所内 Kumamoto (JP). 吉崎栄男 (YOSHIZAKI,
Hideo) [JP/JP]; 〒350-1315 埼玉県狭山市北入曽459-16
Saitama (JP).
- (21)国際出願番号: PCT/JP01/06209 (74)代理人: 青山 葵, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.); 〒
540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMP
ビル青山特許事務所 Osaka (JP).
- (22)国際出願日: 2001年7月18日 (18.07.2001) (81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
- (25)国際出願の言語: 日本語 (76) (77) (78) (79) (80) (81) (82) (83) (84) (85) (86) (87) (88) (89) (90) (91) (92) (93) (94) (95) (96) (97) (98) (99) (100) (101) (102) (103) (104) (105) (106) (107) (108) (109) (110) (111) (112) (113) (114) (115) (116) (117) (118) (119) (120) (121) (122) (123) (124) (125) (126) (127) (128) (129) (130) (131) (132) (133) (134) (135) (136) (137) (138) (139) (140) (141) (142) (143) (144) (145) (146) (147) (148) (149) (150) (151) (152) (153) (154) (155) (156) (157) (158) (159) (160) (161) (162) (163) (164) (165) (166) (167) (168) (169) (170) (171) (172) (173) (174) (175) (176) (177) (178) (179) (180) (181) (182) (183) (184) (185) (186) (187) (188) (189) (190) (191) (192) (193) (194) (195) (196) (197) (198) (199) (200) (201) (202) (203) (204) (205) (206) (207) (208) (209) (210) (211) (212) (213) (214) (215) (216) (217) (218) (219) (220) (221) (222) (223) (224) (225) (226) (227) (228) (229) (230) (231) (232) (233) (234) (235) (236) (237) (238) (239) (240) (241) (242) (243) (244) (245) (246) (247) (248) (249) (250) (251) (252) (253) (254) (255) (256) (257) (258) (259) (260) (261) (262) (263) (264) (265) (266) (267) (268) (269) (270) (271) (272) (273) (274) (275) (276) (277) (278) (279) (280) (281) (282) (283) (284) (285) (286) (287) (288) (289) (290) (291) (292) (293) (294) (295) (296) (297) (298) (299) (300) (301) (302) (303) (304) (305) (306) (307) (308) (309) (310) (311) (312) (313) (314) (315) (316) (317) (318) (319) (320) (321) (322) (323) (324) (325) (326) (327) (328) (329) (330) (331) (332) (333) (334) (335) (336) (337) (338) (339) (340) (341) (342) (343) (344) (345) (346) (347) (348) (349) (350) (351) (352) (353) (354) (355) (356) (357) (358) (359) (360) (361) (362) (363) (364) (365) (366) (367) (368) (369) (370) (371) (372) (373) (374) (375) (376) (377) (378) (379) (380) (381) (382) (383) (384) (385) (386) (387) (388) (389) (390) (391) (392) (393) (394) (395) (396) (397) (398) (399) (400) (401) (402) (403) (404) (405) (406) (407) (408) (409) (410) (411) (412) (413) (414) (415) (416) (417) (418) (419) (420) (421) (422) (423) (424) (425) (426) (427) (428) (429) (430) (431) (432) (433) (434) (435) (436) (437) (438) (439) (440) (441) (442) (443) (444) (445) (446) (447) (448) (449) (450) (451) (452) (453) (454) (455) (456) (457) (458) (459) (460) (461) (462) (463) (464) (465) (466) (467) (468) (469) (470) (471) (472) (473) (474) (475) (476) (477) (478) (479) (480) (481) (482) (483) (484) (485) (486) (487) (488) (489) (490) (491) (492) (493) (494) (495) (496) (497) (498) (499) (500) (501) (502) (503) (504) (505) (506) (507) (508) (509) (510) (511) (512) (513) (514) (515) (516) (517) (518) (519) (520) (521) (522) (523) (524) (525) (526) (527) (528) (529) (530) (531) (532) (533) (534) (535) (536) (537) (538) (539) (540) (541) (542) (543) (544) (545) (546) (547) (548) (549) (550) (551) (552) (553) (554) (555) (556) (557) (558) (559) (5510) (5511) (5512) (5513) (5514) (5515) (5516) (5517) (5518) (5519) (5520) (5521) (5522) (5523) (5524) (5525) (5526) (5527) (5528) (5529) (5530) (5531) (5532) (5533) (5534) (5535) (5536) (5537) (5538) (5539) (55310) (55311) (55312) (55313) (55314) (55315) (55316) (55317) (55318) (55319) (55320) (55321) (55322) (55323) (55324) (55325) (55326) (55327) (55328) (55329) (55330) (55331) (55332) (55333) (55334) (55335) (55336) (55337) (55338) (55339) (55340) (55341) (55342) (55343) (55344) (55345) (55346) (55347) (55348) (55349) (55350) (55351) (55352) (55353) (55354) (55355) (55356) (55357) (55358) (55359) (55360) (55361) (55362) (55363) (55364) (55365) (55366) (55367) (55368) (55369) (55370) (55371) (55372) (55373) (55374) (55375) (55376) (55377) (55378) (55379) (55380) (55381) (55382) (55383) (55384) (55385) (55386) (55387) (55388) (55389) (55390) (55391) (55392) (55393) (55394) (55395) (55396) (55397) (55398) (55399) (553100) (553101) (553102) (553103) (553104) (553105) (553106) (553107) (553108) (553109) (553110) (553111) (553112) (553113) (553114) (553115) (553116) (553117) (553118) (553119) (553120) (553121) (553122) (553123) (553124) (553125) (553126) (553127) (553128) (553129) (553130) (553131) (553132) (553133) (553134) (553135) (553136) (553137) (553138) (553139) (553140) (553141) (553142) (553143) (553144) (553145) (553146) (553147) (553148) (553149) (553150) (553151) (553152) (553153) (553154) (553155) (553156) (553157) (553158) (553159) (553160) (553161) (553162) (553163) (553164) (553165) (553166) (553167) (553168) (553169) (553170) (553171) (553172) (553173) (553174) (553175) (553176) (553177) (553178) (553179) (553180) (553181) (553182) (553183) (553184) (553185) (553186) (553187) (553188) (553189) (553190) (553191) (553192) (553193) (553194) (553195) (553196) (553197) (553198) (553199) (553200) (553201) (553202) (553203) (553204) (553205) (553206) (553207) (553208) (553209) (553210) (553211) (553212) (553213) (553214) (553215) (553216) (553217) (553218) (553219) (553220) (553221) (553222) (553223) (553224) (553225) (553226) (553227) (553228) (553229) (553230) (553231) (553232) (553233) (553234) (553235) (553236) (553237) (553238) (553239) (553240) (553241) (553242) (553243) (553244) (553245) (553246) (553247) (553248) (553249) (553250) (553251) (553252) (553253) (553254) (553255) (553256) (553257) (553258) (553259) (553260) (553261) (553262) (553263) (553264) (553265) (553266) (553267) (553268) (553269) (553270) (553271) (553272) (553273) (553274) (553275) (553276) (553277) (553278) (553279) (553280) (553281) (553282) (553283) (553284) (553285) (553286) (553287) (553288) (553289) (553290) (553291) (553292) (553293) (553294) (553295) (553296) (553297) (553298) (553299) (553300) (553301) (553302) (553303) (553304) (553305) (553306) (553307) (553308) (553309) (553310) (553311) (553312) (553313) (553314) (553315) (553316) (553317) (553318) (553319) (553320) (553321) (553322) (553323) (553324) (553325) (553326) (553327) (553328) (553329) (553330) (553331) (553332) (553333) (553334) (553335) (553336) (553337) (553338) (553339) (553340) (553341) (553342) (553343) (553344) (553345) (553346) (553347) (553348) (553349) (553350) (553351) (553352) (553353) (553354) (553355) (553356) (553357) (553358) (553359) (553360) (553361) (553362) (553363) (553364) (553365) (553366) (553367) (553368) (553369) (553370) (553371) (553372) (553373) (553374) (553375) (553376) (553377) (553378) (553379) (553380) (553381) (553382) (553383) (553384) (553385) (553386) (553387) (553388) (553389) (553390) (553391) (553392) (553393) (553394) (553395) (553396) (553397) (553398) (553399) (553400) (553401) (553402) (553403) (553404) (553405) (553406) (553407) (553408) (553409) (553410) (553411) (553412) (553413) (553414) (553415) (553416) (553417) (553418) (553419) (553420) (553421) (553422) (553423) (553424) (553425) (553426) (553427) (553428) (553429) (553430) (553431) (553432) (553433) (553434) (553435) (553436) (553437) (553438) (553439) (553440) (553441) (553442) (553443) (553444) (553445) (553446) (553447) (553448) (553449) (553450) (553451) (553452) (553453) (553454) (553455) (553456) (553457) (553458) (553459) (553460) (553461) (553462) (553463) (553464) (553465) (553466) (553467) (553468) (553469) (553470) (553471) (553472) (553473) (553474) (553475) (553476) (553477) (553478) (553479) (553480) (553481) (553482) (553483) (553484) (553485) (553486) (553487) (553488) (553489) (553490) (553491) (553492) (553493) (553494) (553495) (553496) (553497) (553498) (553499) (553500) (553501) (553502) (553503) (553504) (553505) (553506) (553507) (553508) (553509) (553510) (553511) (553512) (553513) (553514) (553515) (553516) (553517) (553518) (553519) (553520) (553521) (553522) (553523) (553524) (553525) (553526) (553527) (553528) (553529) (553530) (553531) (553532) (553533) (553534) (553535) (553536) (553537) (553538) (553539) (553540) (553541) (553542) (553543) (553544) (553545) (553546) (553547) (553548) (553549) (553550) (553551) (553552) (553553) (553554) (553555) (553556) (553557) (553558) (553559) (553560) (553561) (553562) (553563) (553564) (553565) (553566) (553567) (553568) (553569) (553570) (553571) (553572) (553573) (553574) (553575) (553576) (553577) (553578) (553579) (553580) (553581) (553582) (553583) (553584) (553585) (553586) (553587) (553588) (553589) (553590) (553591) (553592) (553593) (553594) (553595) (553596) (553597) (553598) (553599) (553600) (553601) (553602) (553603) (553604) (553605) (553606) (553607) (553608) (553609) (553610) (553611) (553612) (553613) (553614) (553615) (553616) (553617) (553618) (553619) (553620) (553621) (553622) (553623) (553624) (553625) (553626) (553627) (553628) (553629) (553630) (553631) (553632) (553633) (553634) (553635) (553636) (553637) (553638) (553639) (553640) (553641) (553642) (553643) (553644) (553645) (553646) (553647) (553648) (553649) (553650) (553651) (553652) (553653) (553654) (553655) (553656) (553657) (553658) (553659) (553660) (553661) (553662) (553663) (553664) (553665) (553666) (553667) (553668) (553669) (553670) (553671) (553672) (553673) (553674) (553675) (553676) (553677) (553678) (553679) (553680) (553681) (553682) (553683) (553684) (553685) (553686) (553687) (553688) (553689) (553690) (553691) (553692) (553693) (553694) (553695) (553696) (553697) (553698) (553699) (553700) (553701) (553702) (553703) (553704) (553705) (553706) (553707) (553708) (553709) (553710) (553711) (553712) (553713) (553714) (553715) (553716) (553717) (553718) (553719) (553720) (553721) (553722) (553723) (553724) (553725) (553726) (553727) (553728) (553729) (553730) (553731) (553732) (553733) (553734) (553735) (553736) (553737) (553738) (553739) (5537340) (5537311) (5537312) (5537313) (5537314) (5537315) (5537316) (5537317) (5537318) (5537319) (5537320) (5537321) (5537322) (5537323) (5537324) (5537325) (5537326) (5537327) (5537328) (5537329) (5537330) (5537331) (5537332) (5537333) (5537334) (5537335) (5537336) (5537337) (5537338) (5537339) (55373310) (55373311) (55373312) (55373313) (55373314) (55373315) (55373316) (55373317) (55373318) (55373319) (55373320) (55373321) (55373322) (55373323) (55373324) (55373325) (55373326) (55373327) (55373328) (55373329) (55373330) (55373331) (55373332) (55373333) (55373334) (55373335) (55373336) (55373337) (55373338) (55373339) (553733310) (553733311) (553733312) (553733313) (553733314) (553733315) (553733316) (553733317) (553733318) (553733319) (553733320) (553733321) (553733322) (553733323) (553733324) (553733325) (553733326) (553733327) (553733328) (553733329) (553733330) (553733331) (553733332) (553733333) (553733334) (553733335) (553733336) (553733337) (553733338) (553733339) (553733340) (553733341) (553733342) (553733343) (553733344) (553733345) (553733346) (553733347) (553733348) (553733349) (553733350) (553733351) (553733352) (553733353) (553733354) (553733355) (553733356) (553733357) (553733358) (553733359) (553733360) (553733361) (553733362) (553733363) (553733364) (553733365) (553733366) (553733367) (553733368) (553733369) (553733370) (553733371) (553733372) (553733373) (553733374) (553733375) (553733376) (553733377) (553733378) (553733379) (553733380) (553733381) (553733382) (553733383) (553733384) (553733385) (553733386) (553733387) (553733388) (553733389) (553733390) (553733391) (553733392) (553733393) (553733394) (553733395) (553733396) (553733397) (553733398) (553733399) (5537333100) (5537333101) (5537333102) (5537333103) (5537333104) (5537333105) (5537333106) (5537333107) (5537333108) (5537333109) (5537333110) (5537333111) (5537333112) (5537333113) (5537333114) (5537333115) (5537333116) (5537333117) (5537333118) (5537333119) (5537333120) (5537333121) (5537333122) (5537333123) (5537333124) (5537333125) (5537333126) (5537333127) (5537333128) (5537333129) (5537333130) (5537333131) (5537333132) (5537333133) (5537333134) (5537333135) (5537333136) (5537333137) (5537333138) (5537333139) (5537333140) (5537333141) (5537333142) (5537333143) (5537333144) (

WO 02/08249 A1



PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

添付公開書類:
— 國際調査報告書

- (84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明細書

カルシウムイオン結合性蛋白質の精製方法

技術分野

本発明は、陽イオン交換法によるカルシウムイオン結合性蛋白質の精製方法に関する。より詳細には、カルシウムイオン結合性蛋白質を精製する工程において、該蛋白質をカルシウムイオン存在下で陽イオン交換担体に吸着させ、洗浄後、溶出する工程を含むことからなる該蛋白質の精製方法、及び前記方法により得られる実質的に不純物を含有しないカルシウムイオン結合性蛋白質に関する。

背景技術

一般に、目的の蛋白質を不純物から分離・精製する際には、個々の蛋白質が持つ、分子サイズ、表面荷電、溶解性等の物理的及び化学的性質が利用される。蛋白質化学において通常使用される精製方法として、例えば、塩析法、限外濾過法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル濾過クロマトグラフィー法、アフィニティクロマトグラフィー法等が挙げられる。生体組織、細胞、血中など、多種類の蛋白質が混在する中から目的の蛋白質を精製する場合は、上記方法の複雑な組み合わせを必要とすることが多い。しかしながら、ある種の蛋白質が持つ共通した性質を利用することにより、より特異的な精製法を確立することも可能である。

例えば、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた特殊な精製方法として、陰イオン交換樹脂に蛋白質を吸着させ、2価陽イオンで溶出させることにより特異的に2価陽イオン結合性蛋白質を精製する方法が、特開平2-200180公報に記載されている。この方法では、2価陽イオン結合性蛋白質を含有する溶液にエチレンジアミン四酢酸（E D T A）などのキレート剤を添加し、一旦、2価陽イオンを除去した後、M o n o Qのような陰イオン交換樹脂に結合させ、次いで塩化ナトリウム及び塩化カルシウムの添加により、2価陽イオン結合性蛋白質を溶出する方法が取られている。しかし、自然界に存在する蛋白質の多くは生理的条件下において陰性に荷電しているために、この方法では、目的とする蛋白質以外の夾雜物が優先的に陰イオン交換樹脂に吸着し効率的に精製できない。従って、陰イオン交換樹脂に目的の蛋白質を吸着させることにより精製する方法は、少量

の蛋白質溶液又は精製工程の進んだ段階において使用することが望ましい。

また、特開平7-258286公報には、陰イオン交換法によるカルシウムイオン結合性のビタミンK依存性蛋白質を精製する方法が記載されている。この方法は、ビタミンK依存性蛋白質を含有する溶液に塩化カルシウムを添加し、これを陰イオン交換樹脂に素通りさせることにより随伴する不純蛋白質から目的の蛋白質を分離するという構成であるが、この方法では、目的の蛋白質を含む素通り画分のボリュームが増えることになり、大量スケールで行う場合にはその後の処理が煩雑となる。

5

カルシウムイオン結合性蛋白質の一つであるアネキシンVは、抗血液凝固作用、角膜上皮伸展作用、ホスホリパーゼA₂阻害作用などの生理活性を有する、分子量約34kDaの糖鎖を持たない単純蛋白質であり、ヒト胎盤をはじめとする生体内の組織及び分泌液に広く分布することが知られている (Chem. Pharma. Bull., 38, 1957-1960, 1990)。アネキシンVは、カルシウムイオンを介して脂質膜に結合する性質を有することから、カルシウムイオン結合性蛋白質と呼ばれる。

10

アネキシンVは、古くはヒトや動物の臓器から抽出されていたが（特開昭62-174023公報）、今日では、遺伝子組換え技術により大腸菌・酵母などで生産させる（特開昭64-20095号公報、特開平3-219875号公報）ことにより取得することができる。

15

従来、アネキシンVは、該アネキシンV含有液を沈殿、膜濾過及び遠心分離等により前処理した後、硫酸分画、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー及びアフィニティクロマトグラフィー等を組み合わせた方法により精製されていた (Jurgen Romischら、Biochem. J. 272, 223-229, 1990, T. R. Hawthorneら、Journal of Biotechnology 36, 129-143, 1994)。

20

発明の開示

(発明が解決しようとする技術的課題)

しかしながら、これらの方法は、精製工程が煩雑で相当な労力と時間を要するので再現性や収率等の点で問題を生じる可能性があり、工業スケールにおけるアネキシンVの精製方法として採用し難い。さらに、その精製工程には、アネキシ

ンVの精製度を上げるために高価なヘパリンセファロースが使用されており、コスト面においても大量スケールの精製方法として不向きである。また、本発明者らが特開平3-219875号公報に開示した製造方法、すなわち、前処理後のある程度夾雑物を除いた蛋白質溶液を陰イオン交換クロマトグラフィーに供する方法により、アネキシンVを工業的に精製することは可能であるが、本発明を凌駕するものではない。

上述したように、従来の方法は、工業スケールの利用に対し、経済性・効率性・操作性等の問題を有する。

本発明の目的は、カルシウムイオン結合性蛋白質及び夾雑物を含有する液体から、カルシウムイオン結合性蛋白質を、キレート剤を添加するような前処理をすることなく、簡便且つ効率的に分離精製する方法を提供することにある。

また、本発明の他の目的は、上記の方法によって精製される高純度のアネキシンVを提供することにある。

(その解決方法)

本発明者らは、上記の目的を達成するために銳意研究を重ねた結果、カルシウムイオン結合性蛋白質の一つであるアネキシンVが、塩化カルシウムの存在下、且つ中性pH近傍でSP-セファロース陽イオン交換担体に吸着することを発見した。しかも、このアネキシンVのSP-セファロース陽イオン交換担体への吸着はカルシウムイオンに特異的なものであり、カルシウムイオン以外の他の2価陽イオン、例えば、マグネシウムイオンの存在下ではかかる吸着はほとんど認められなかった。この知見に基づいて、遺伝子組換え技術により得たアネキシンV産生細胞の大量破碎液に塩化カルシウムを添加し、塩化カルシウムを含む塩化アンモニウム緩衝液で平衡化したSP-セファロース陽イオン交換担体に接触し、洗浄後、次いで、塩化カルシウム濃度の低下もしくは除去、又はカルシウムイオン存在下で塩化ナトリウムを含む塩化アンモニウム緩衝液で溶出したところ、いずれの方法においても、きわめて高純度のアネキシンVを精製することに成功した。更に、該陽イオン交換クロマトグラフィーをpH9.0で行うことにより、微量に存在するプロテアーゼを除去することに成功し、本発明を完成するに至った。

従って、本発明は、塩化カルシウム存在下でSP-セファロース陽イオン交換担体を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーによる天然及び組換えカルシウムイオン結合性蛋白質の精製方法を包含する。

また、本発明は、上記方法によって得られる天然及び組換えカルシウムイオン結合性蛋白質を包含する。
5

図面の簡単な説明

図1A及び図1Bは、アネキシンV構造遺伝子のクローニング及び該遺伝子による形質転換酵母の作製手順を示す。

10 図2において、a)、b)及びc)は、それぞれ陽イオン交換クロマトグラフィーにかける前の標品、素通り画分及び洗浄後の溶出画分を、ゲルろ過クロマトグラフィー法で分析した結果を示す。

図3は、陽イオン交換クロマトグラフィーの洗浄後の溶出画分をゲルろ過クロマトグラフィー法で分析した結果を示す。

図4は、アネキシンVIのSP-セファロース溶出パターンを示す。

15 図5は、アネキシンVIのSDS-PAGEの結果を示す写真である。レーン1：BioRadプレステインドマーカー蛋白質：ホスホリラーゼB(116,000)、BSA(80,000)、卵アルブミン(52,500)、カルボニックアンヒドラーーゼ(34,900)、ダイズトリプシンインヒビター(29,900)、リゾチーム(21,800)；レーン2：アネキシンVI標準品；レーン3：DEAE-Toyopearl溶出液(サンプル)；レーン4：SP-セファロース、フラクションNo.5；レーン5：フラクションNo.7；レーン6：フラクションNo.9、レーン7：フラクションNo.16；レーン8：フラクションNo.51；レーン9：フラクションNo.54；レーン10：フラクションNo.57。

図6は、血液凝固第X因子のSP-セファロース溶出パターンを示す。

25 図7は、血液凝固第X因子のSDS-PAGEの結果を示す写真である。レーン1：BioRadプレステインドマーカー蛋白質：ホスホリラーゼB(116,000)、BSA(80,000)、卵アルブミン(52,500)、カルボニックアンヒドラーーゼ(34,900)、ダイズトリプシンインヒビター(29,900)、リゾチーム(21,800)；レーン2：市販血液凝固第X因子；レーン3：フラクションNo.4；レーン4：フラクション

N_o. 7 ; レーン 5 : フラクション N_o. 11 ; レーン 6 : フラクション N_o. 1
2。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法は、カルシウムイオン結合性蛋白質を含有する液体を、カルシウムイオン存在下で陽イオン交換担体に接触させる工程、次いで、カルシウムイオン濃度を低下もしくは除去するか、又はカウンターイオン（塩）濃度を高めるか、又はこれらを組み合わせた方法によって該蛋白質を溶出・回収する工程により特徴付けられる。この方法により、カルシウムイオン結合性蛋白質が高純度で精製される。上記の陽イオン交換担体に接触させる工程は、バッチ式又はクロマトグラフィーの様式で使用される。クロマトグラフィー法で行う場合のカラムサイズは、製造スケールによって適宜選択される。

本発明に使用される陽イオン交換担体は、一般に市販されている SP-セファロース (SP-Sepharose) 、 CM-セファロース (CM-Sepharose) 、 CM-セルロース (CM-cellulose) 、 SE-セルロース (SE-cellulose) 、 S-スフェロデックス (S-Spheredex) 、 SP-スフェロシリル (SP-Spherosil) 等いずれの担体であってもよいが、好ましくは、 SP-セファロースが使用される。

担体に接触させる蛋白質溶液の量は、その濃度及び担体の吸着能力に依存するが、例えば、 SP-セファロースでは、担体 1 リットル当たり、蛋白質 0.1 ~ 30 g の範囲で使用可能である。好ましくは、担体 1 リットル当たり、 15 ~ 20 g が使用される。

陽イオン交換担体に吸着させる時の線速は、例えば、 1 ~ 150 cm / 時で使用できるが、 15 ~ 100 cm / 時で使用するのが好ましく、 50 ~ 80 cm / 時で使用するのがさらに好ましい。また、吸着した蛋白質を溶出する際の線速は、 1 ~ 150 cm / 時の範囲で使用可能であるが、 30 ~ 100 cm / 時で使用するのが好ましく、 30 ~ 80 cm / 時で使用するのがさらに好ましい。

陽イオン交換担体への吸着溶出に使用される緩衝液は、一般的にイオン交換クロマトグラフィーに使用される塩化アンモニウム緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液及びトリス塩酸緩衝液等から適当なものを選択すればよい。好ましくは、塩化アンモニウム緩衝液が選択される。緩衝液の濃度は 5 ~ 100 mM の範囲で

使用することができる。好ましくは、10～40 mMの範囲で使用される。また、そのpH値は、5～10の範囲で使用可能であるが、プロテアーゼが除去される条件下、8～9.5で使用することが好ましい。更に好ましくは、20 mM (pH 9.0近傍) 塩化アンモニウム緩衝液が使用される。

5 本発明を構成するカルシウムイオンの供給源として、塩化カルシウム、炭酸カルシウム等、カルシウムイオンを供給する物質であるならばどの様なものでも利用できるが、好ましくは、塩化カルシウムが使用される。

組織や細胞の破碎液、又は血漿などに、多量の塩化カルシウムを添加すると、
10 塩析効果により疎水性の蛋白質や高分子化合物が析出してくる場合がある。したがって、カルシウムイオンの濃度は、カルシウムイオン結合性蛋白質が陽イオン交換担体に結合し、単離し得る範囲内で使用され得るが、カルシウムイオン結合性蛋白質を含有する液体から沈殿を生じない適當濃度のカルシウムイオンを使用することが望ましい。

15 カルシウムイオン結合性蛋白質を陽イオン交換担体に吸着させるとときには、好ましくは5～100 mMのカルシウムイオン濃度が使用される。更に好ましくは、10～30 mMのカルシウムイオン濃度が使用される。上記陽イオン交換担体への吸着溶出に使用する緩衝液との組み合わせにおいては、20 mM塩化カルシウムを含む20 mM塩化アンモニウム緩衝液 (pH 9.0) を使用することが望ましい。

20 また、吸着したカルシウムイオン結合性蛋白質は、上記緩衝液からカルシウムイオンを除去もしくはその濃度を低下させるか、又はカルシウムイオン以外のカウンターイオンを添加するか、又はこれらを組み合わせることにより溶出することができる。カウンターイオンとして、Na⁺、Li⁺、K⁺イオン等が挙げられるが、好ましくは、上記塩化アンモニウム緩衝液に1～500 mM、更に好ましくは50～500 mM、更に一層好ましくは50～300 mMの塩化ナトリウムを添加することにより、最も好ましくは、20 mM塩化カルシウムを含む20 mM塩化アンモニウム緩衝液 (pH 9.0) に、200 mM塩化ナトリウムを添加することにより溶出される。また、吸着したカルシウムイオン結合性蛋白質は、単に塩化カルシウム濃度を5 mM未満に低下させることにより、陽イオン交換担

体から溶出される。

本発明の方法は、単独で使用しても、カルシウムイオン結合性蛋白質を少なくとも純度80%以上に精製し得る能力を有するが、他の精製方法との組み合わせによって、より効果的に使用される。例えば、カルシウムイオン結合性蛋白質を含有する液体に不溶物が混在する場合は、これを除去するために一般に用いられる遠心分離法、塩析法、膜濾過法等の前処理を行った後、本発明を使用することが望ましい。
5

また、上記方法の他に、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、
10 吸着クロマトグラフィーなどの各種クロマトグラフィー等の精製工程を取り入れることによって、より高純度のカルシウムイオン結合蛋白質を得ることができる。
本発明の方法は、前記方法のいずれの工程で使用してもよい。好ましくは、不溶物除去処理の後、本発明が使用され、次いで陰イオン交換クロマトグラフィーが
15 行われる。より具体的には、陽イオン交換クロマトグラフィーで得たアネキシンV含有画分を、50 mM塩化ナトリウムを含む10 mMリン酸ナトリウム緩衝液
(pH 7.4)で平衡化したQ-セファロースカラムにアプライし、洗浄後、50 mMから500 mMまでの塩化ナトリウムの直線濃度勾配で溶出し、より精製度の高いアネキシンVを得ることができる。

本発明の方法に使用されるカルシウムイオン結合性蛋白質の具体例としては、
20 アネキシンI～VII等が代表的例として挙げられるが、これら以外にも血液凝固第X因子等、カルシウムイオンに結合する性質を有する蛋白質であるならばどの様な蛋白質であってもよい。

また、本発明の方法は、上記のカルシウムイオン結合性蛋白質を生産する天然の動物や組換え操作を施した動物の血液、体液及び組織破碎液、並びに植物細胞、
25 細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞及び動物細胞等を含む組換え体の細胞破碎液及び培養上清に対しても効果的に使用することができる。好ましくは、本発明の方法は、カルシウムイオン結合性蛋白質を生産する組換え酵母に使用される。更に好ましくは、本発明の方法はアネキシンV産生酵母の細胞破碎液又はその培養上清に使用される。

このようにして得られるアネキシンVは特異的生理活性を有し、単独であるいは薬剤として認容される適當な担体、希釈液、安定剤又は保存剤等を添加することにより、注射剤、点眼剤、経口剤、座薬等の任意慣用の方法で医薬品に使用される。

5 (従来技術より有効な効果)

本発明によると、カルシウムイオン結合性蛋白質を効率的、且つ高純度に精製する方法及びこの方法により得られる実質的に不純物を含有しない該カルシウムイオン結合性蛋白質が提供される。

本発明の方法に従えば、生理的条件下では陰性に帶電している多くの蛋白質は10陽イオン交換担体を素通りするが、カルシウムイオンと複合体を形成するカルシウムイオン結合性蛋白質は陽イオン交換担体に優先的に吸着する。したがって、本発明の方法は、陽イオン交換担体の吸着能力が、随伴する目的以外の蛋白質によって阻害されることなく一度に大量の試料を処理すること可能にする。

実施例

15 調製例：アネキシンV産生組換え体酵母の作製

アネキシンV産生組換え体酵母は、特許出願公開公報（特開平3-219875）の方法に従い作製した。その作製方法を図1に簡単に示した。なお、図1における「CPB-I」は「アネキシンV」と同義である。

(1) アネキシンV構造遺伝子のクローニング

ヒト胎盤cDNAライブラリー（クローンテックラボラトリ一社）より、抗アネキシンVモノクローナル抗体を用いたイムノスクリーニング法でアネキシンV構造遺伝子を有するファージを単離した。次いでファージより調製したDNAを制限酵素EcoRIで消化して得た断片をpUC118ベクターのEcoRI切断部位に挿入してpMKT7を構築した。

25 (2) 発現プラスミドの構築

pMKT7を制限酵素NcoI及びSacIで消化後、アネキシンV構造遺伝子を含むDNA断片をアガロース電気泳動により分離した。合成リンカーを付加して両端をXbaI切断部位とBamHI切断部位に変換し、これを発現ベクタ-pPS1のXbaI及びBamHI切断部位に挿入して発現プラスミドpAPP

C P B I を構築した。

(3) 組換え体の作製

酢酸リチウム法により宿主酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* AH22) を発現プラスマド p A P C P B · I で形質転換した。形質転換後、ロイシンを含まない寒天培地上に現れたコロニーを単離して発現量を測定した。発現量の高いクローンについて、寒天培地への塗布、コロニー単離、発現量測定を繰り返して、形質の安定した組換え酵母を得た。

実施例 1：組換えアネキシンVの精製

(1) アネキシンV産生組換え酵母の培養

アネキシンV産生組換え酵母を 2 L の選択合成培地にて 28°C、3 日間培養した。次いでこれを 88 L の選択培地に接種し、28°C、2 日間培養した。更に、これを 810 L の半合成培地 (培地 1 L 中にショ糖 40 g、酵母エキス 5 g、硫酸アンモニウム 5 g、硫酸マグネシウム・7水和物 0.5 g) に植え継ぎ 28°C、24 時間培養した。

(2) アネキシンVの大量精製前処理

上記の大量培養菌液を 0.1 μm のメンブランフィルターでろ過し、組換え酵母菌を集菌した。これをフレンチプレス型細胞破碎機により物理的刺激を加えて破碎した。この破碎液を上記メンブランフィルターでろ過した後、ろ液を限外ろ過器により濃縮した。これに酢酸を加えて等電点沈殿 (pH 5.0) を行い、生成した沈殿物を上記メンブランフィルターでろ過、除去し、ろ液の pH をアンモニアで 9.0 に調整した後、再び限外ろ過器により濃縮した (前処理液)。

(3) 陽イオン交換クロマトグラフィー (塩化カルシウム濃度の低下又は除去による溶出)

前処理液に塩化カルシウム溶液を終濃度が 20 mM となるように添加し、S P -セファロース (ファルマシア製) を用いる陽イオン交換クロマトグラフィーに供した。すなわち、20 mM 塩化カルシウム及び 50 mM 塩化ナトリウムを含む 20 mM 塩化アンモニウム緩衝液 (pH 9.0) で平衡化したカラムに、塩化カルシウムを添加した前処理液をアプライし、同緩衝液で洗浄後更に 20 mM 塩化カルシウムを含む 20 mM 塩化アンモニウム緩衝液 (pH 9.0) で洗浄した。

その後、20 mM 塩化アンモニウム緩衝液 (pH 9.0) でアネキシンVを溶出した。

(4) 陽イオン交換クロマトグラフィー (塩化ナトリウム濃度による溶出)

上記 (3) と同様に、前処理液に塩化カルシウム溶液を終濃度が 20 mM となるように添加し、S P-セファロースを用いる陽イオン交換クロマトグラフィーに供した。すなわち、20 mM 塩化カルシウム及び 50 mM 塩化ナトリウムを含む 20 mM 塩化アンモニウム緩衝液 (pH 9.0) で平衡化したカラムに、塩化カルシウムを添加した前処理液をアプライし、同緩衝液で洗浄後、50 mM から 10 300 mM までの塩化ナトリウムの直線濃度勾配 (20 mM 塩化カルシウムを含む 20 mM 塩化アンモニウム緩衝液 (pH 9.0)) でアネキシンVを溶出した (吸着及び溶出時の線速 : 56.7 cm/時)。陽イオン交換クロマトグラフィー前の標品、素通り画分及び溶出画分を、ゲルろ過クロマトグラフィーで分離した時の溶出パターンを図2の (a)、(b) 及び (c) にそれぞれ示した。ゲルろ過は、0.14 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) で平衡化した TSKgel G3000 SWx1 (7.8 mm ID × 30 cm) に試料 20 μL をアプライし、線速 125.6 cm/時で行った。また、陽イオン交換クロマトグラフィーによる分析結果を表1に示した。純度一溶出画分のゲルろ過クロマトグラフィーによる分析結果を表1に示した。純度は溶出パターンより求めた値を示す。

20 (5) 陰イオン交換クロマトグラフィー (従来法との比較)

前処理液を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。前記の前処理液を、50 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) で平衡化した Q-セファロース (ファルマシア製) カラムにアプライし、洗浄後、50 mM から 300 mM までの塩化ナトリウムの直線濃度勾配でアネキシンVを溶出した。溶出画分のゲルろ過クロマトグラフィーによる分析結果を表1に示した。

従来法及び本発明法で得られたアネキシンVの抗凝固活性を、他の精製工程を取り入れて更に高純度にした後に測定した。抗凝固活性の測定は、日本薬局方 (第13改正、900~901頁) に収載されているヘパリンナトリウムの定量

法に順じて行った。標準品（従来法により精製されたアネキシンV）1 mgが凝固を延長する時間を1ユニット（U）と定義し、凝固活性値を求めた。その結果、本発明法に基づき得られるアネキシンVの失活は認められなかった（表1）。

表1

	陰イオン交換クロマト グラフィー法	陽イオン交換クロマト グラフィー法
純度 (%)	81.86	100
活性(U/mg)	0.9~1.0	0.9~1.0

5 実施例2：組換えアネキシンVの精製

実施例1の工程（4）陽イオン交換クロマトグラフィーにおいて、20 mM塩化カルシウム及び50 mM塩化ナトリウムを含む20 mM塩化アンモニウム緩衝液（pH 9.0）の代わりに20 mM塩化カルシウム及び50 mM塩化ナトリウムを含む20 mMクエン酸緩衝液（pH 6.0）を用い、50 mMから300 mMまでの塩化ナトリウムの直線濃度勾配（20 mM塩化カルシウムを含む20 mM塩化アンモニウム緩衝液（pH 9.0）の代わりに20 mMクエン酸緩衝液（pH 6.0）を用いた他は実施例1と同様にして、組換えアネキシンVを精製した（ただし、線速は吸着時：15.6~54.6 cm/時、溶出時：39 cm/時）。

15 陽イオン交換クロマトグラフィーの溶出画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離した時の溶出パターンを図3に示した。

実施例3：胎盤からのアネキシンVIの精製

胎盤1個（約500 g）の羊膜及び臍帯を除きスライスした。2 Lの生理食塩液を加えて洗浄した後、肉挽器でミンチにした。次に、400 mLの5 mM塩化カルシウム、0.1% Triton X-100及び5 mMベンズアミジン含有50 mMトリス-HCl緩衝液（pH 7.4）を加え、ワーリングブレンダーでホモジナイズした。これを10,000 rpmで20分間遠心して沈殿部分を集め、300 mLの50 mM EDTA含有50 mMトリス-HCl緩衝液（pH 7.4）に再び懸濁し、ホモジナイズした。これを再び10,000 rpmで20分間遠心して、上清の抽出液を回収し（約300 mL）、これに硫酸63 gを添加して3

0 %飽和硫安液を調製した。遠心により沈殿を除去後、上清に更に 54 g の硫安を添加（60 %飽和硫安）して、沈殿してくるアネキシンVI画分を集めた。なお、アネキシンVは更に80 %飽和硫安まで塩濃度を上昇させた沈殿部分に多くが回収された。

5 60 %飽和硫安沈殿を 50 mM トリス-HCl 緩衝液（pH 7.4）で溶解し、同緩衝液に対して透析した。80 mL の透析液を同緩衝液で平衡化した DEAE-Toyopearl（3×20 cm）に吸着させた。同緩衝液で洗浄後、同緩衝液（1 80 mL）から 0.3 M NaCl を含有する同 50 mM トリス-HCl 緩衝液（pH 7.4）（180 mL）までの勾配で溶出（フラクション 4 mL／チューブ）すると、目的のアネキシンVIはフラクション No. 46～50 の部分に溶出された。アネキシンVI画分を 20 mM 塩化アンモニウム（pH 9.0）に透析し、最終的に 20 mM 塩化カルシウム含有 20 mM 塩化アンモニウム緩衝液（pH 9.0）にした。これを 20 mM 塩化カルシウム含有 20 mM 塩化アンモニウム緩衝液（pH 9.0）で平衡化した SP-セファロースFF（1.5×8 cm）へ吸着させ（図4、フラクション No. 1～15）、同緩衝液で洗浄後、同緩衝液に 0.5 M NaCl を添加した液で溶出した（図4、フラクション No. 45～70）。各段階の試料について非還元 SDS-PAGE を行い、その結果を図5に示した。

10 15

実施例4：血液凝固第X因子の精製

20 市販血液凝固第X因子（約 1 mg）を 20 mM トリス-HCl 緩衝液（pH 8.0）で透析し、これに 200 mM 塩化カルシウムを 10 分の 1 量添加して、最終的に 20 mM 塩化カルシウム含有 20 mM トリス-HCl 緩衝液（pH 8.0）にした。20 mM 塩化カルシウム含有 20 mM トリス-HCl 緩衝液（pH 8.0）で平衡化した SP-セファロースFF（0.8×7 cm）に吸着させ、20 mM 塩化カルシウム含有 20 mM トリス-HCl 緩衝液（pH 9.0）で洗浄後、0.3 M 塩化ナトリウムを含有する 20 mM トリス-HCl 緩衝液（pH 9.0）で溶出した。なお、全ての工程に 5 mM ベンズアミジンを加えた（ベンズアミジン自身に A 280 に UV 吸収があるので溶出パターンは必ずしも明確ではない）（図6）。図7に各画分について非還元 SDS-PAGE を行った結果を示す。

25

請求の範囲

1. カルシウムイオン結合性蛋白質を含有する試料からカルシウムイオン結合性蛋白質を陽イオン交換体を使用することにより精製する方法であつて、該試料をカルシウムイオン存在下で陽イオン交換担体に接触させてカルシウムイオン結合性蛋白質を陽イオン交換担体に吸着させる工程、並びにカルシウムイオン濃度を低下もしくは除去する方法、カルシウムイオン以外のカウンターイオンを添加する方法及びこれらの組み合わせからなる方法のいずれかにより、該カルシウムイオン結合性蛋白質を溶出・回収する工程を含むことを特徴とする方法。
5
2. 前記吸着工程が、5～100mMのカルシウムイオン存在下で行われることを特徴とする請求項1に記載の方法。
10
3. 前記吸着工程が、10～30mMのカルシウムイオン存在下で行われることを特徴とする請求項2に記載の方法。
4. 前記吸着工程が、1～150cm/時の線速で行われることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の方法。
15
5. 前記吸着工程が、15～100cm/時の線速で行われることを特徴とする請求項4に記載の方法。
6. 前記吸着工程が、50～80cm/時の線速で行われることを特徴とする請求項4に記載の方法。
7. 前記溶出工程が、カルシウムイオン濃度を5mM未満に低下させることにより行われることを特徴とする請求項1に記載の方法。
20
8. 前記溶出工程が、カルシウムイオン以外のカウンターイオン1～500mMを添加することにより行われることを特徴とする請求項1に記載の方法。
9. 前記溶出工程が、カルシウムイオン以外のカウンターイオン50～500mMを添加することにより行われることを特徴とする請求項1に記載の方法。
25
10. 前記溶出工程が、カルシウムイオン以外のカウンターイオン50～300mMを添加することにより行われることを特徴とする請求項1に記載の方法。
11. 前記カウンターイオンが、 Na^+ 、 Li^+ 及び K^+ よりなる群から選ばれたものである請求項1、8、9又は10に記載の方法。
12. 前記溶出工程が、1～150cm/時の線速で行われることを特徴とす

る請求項1、7、8、9、10又は11に記載の方法。

13. 前記溶出工程が、30～100cm／時の線速で行われることを特徴とする請求項12に記載の方法。

14. 前記溶出工程が、30～80cm／時の線速で行われることを特徴とする請求項12に記載の方法。

15. 前記陽イオン交換担体が、SP-セファロース、CM-セファロース、CM-セルロース、SE-セルロース、S-スフェロデックス、及びSP-スフェロシルよりなる群から選ばれたものである、請求項1に記載の方法。

16. 前記カルシウムイオン結合性蛋白質が、アネキシンI～VIIよりなる群から選ばれたものである、請求項1～15のいずれかに記載の方法。

17. 前記試料が、遺伝子組換え技術により調製されたカルシウムイオン結合性蛋白質を含む、請求項1～16のいずれかに記載の方法。

18. 前記吸着・溶出工程がpH5～10で行われる、請求項1～17のいずれかに記載の方法。

19. 前記吸着・溶出工程がpH8～9.5で行われる、請求項18に記載の方法。

20. 前記吸着・溶出工程がpH9で行われる、請求項19に記載の方法。

21. 前記吸着工程が、10～30mMのカルシウムイオン存在下、pH8～9.5にて15～100cm／時の線速で行われ、前記溶出工程が、カルシウムイオン濃度を5mM未満に低下させるか、又はNa⁺、Li⁺及びK⁺よりなる群から選ばれたカウンターイオン50～300mMを添加することにより30～80cm／時の線速で行われ、前記陽イオン交換担体がSP-セファロースであり、前記カルシウムイオン結合性蛋白質がアネキシンVであり、前記試料が遺伝子組換え技術により調製されたアネキシンVを含むものであり、前記試料に含まれるプロテアーゼが除去される、請求項1に記載の方法。

22. 前記吸着工程が、10～30mMのカルシウムイオン存在下、pH8～9.5にて15～100cm／時の線速で行われ、前記溶出工程が、カルシウムイオン濃度を5mM未満に低下させるか、又はNa⁺、Li⁺及びK⁺よりなる群から選ばれたカウンターイオン500mMを添加することにより30～80cm

／時の線速で行われ、前記陽イオン交換担体がSP-セファロースであり、前記カルシウムイオン結合性蛋白質がアネキシンVIであり、前記試料が天然のアネキシンVIを含むものであり、前記試料に含まれるプロテアーゼが除去される、請求項1に記載の方法。

- 5 23. カルシウムイオン結合性蛋白質を含有する試料をカルシウムイオン存在下で陽イオン交換担体に接触させてカルシウムイオン結合性蛋白質を陽イオン交換担体に吸着させることを特徴とする、陽イオン交換体を用いたカルシウムイオン結合性蛋白質の精製方法。
- 10 24. 5～100 mMのカルシウムイオン存在下で行う、請求項23に記載の方法。
25. 10～30 mMのカルシウムイオン存在下で行う、請求項24に記載の方法。
26. 1～150 cm／時の線速で行う、請求項23～25のいずれかに記載の方法。
- 15 27. 15～100 cm／時の線速で行う、請求項26に記載の方法。
28. 50～80 cm／時の線速で行う、請求項26に記載の方法。
29. 前記陽イオン交換担体が、SP-セファロース、CM-セファロース、CM-セルロース、SE-セルロース、S-スフェロデックス、及びSP-スフェロシリルよりなる群から選ばれたものである、請求項23に記載の方法。
- 20 30. 前記カルシウムイオン結合性蛋白質が、アネキシンI～VIIよりなる群から選ばれたものである、請求項23～29のいずれかに記載の方法。
31. 前記試料が、遺伝子組換え技術により調製されたカルシウムイオン結合性蛋白質を含む、請求項23～30のいずれかに記載の方法。
32. pH 5～10で行う、請求項23～31のいずれかに記載の方法。
- 25 33. pH 8～9.5で行う、請求項32に記載の方法。
34. pH 9で行う、請求項33に記載の方法。
35. 請求項1～34のいずれかに記載の方法により得られるゲルfiltration分析法により、单一ピークの高純度カルシウムイオン結合性蛋白質。

図 1 A

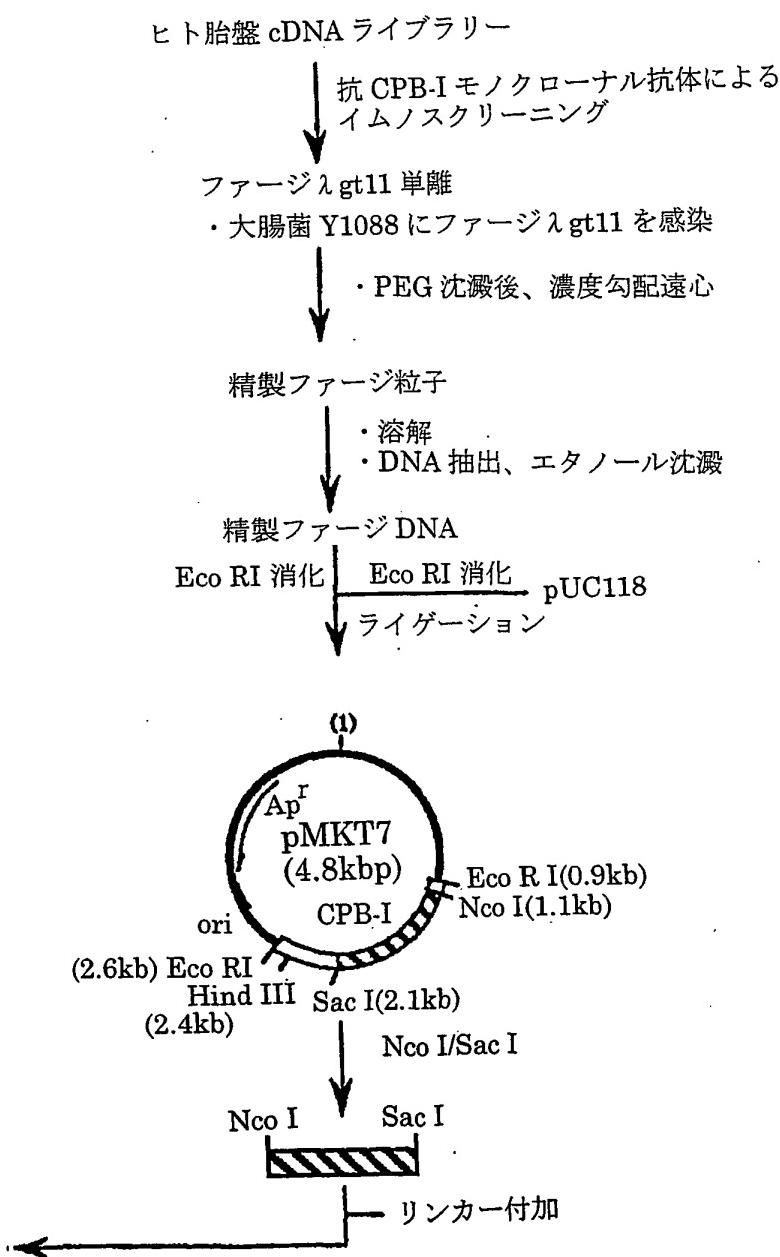
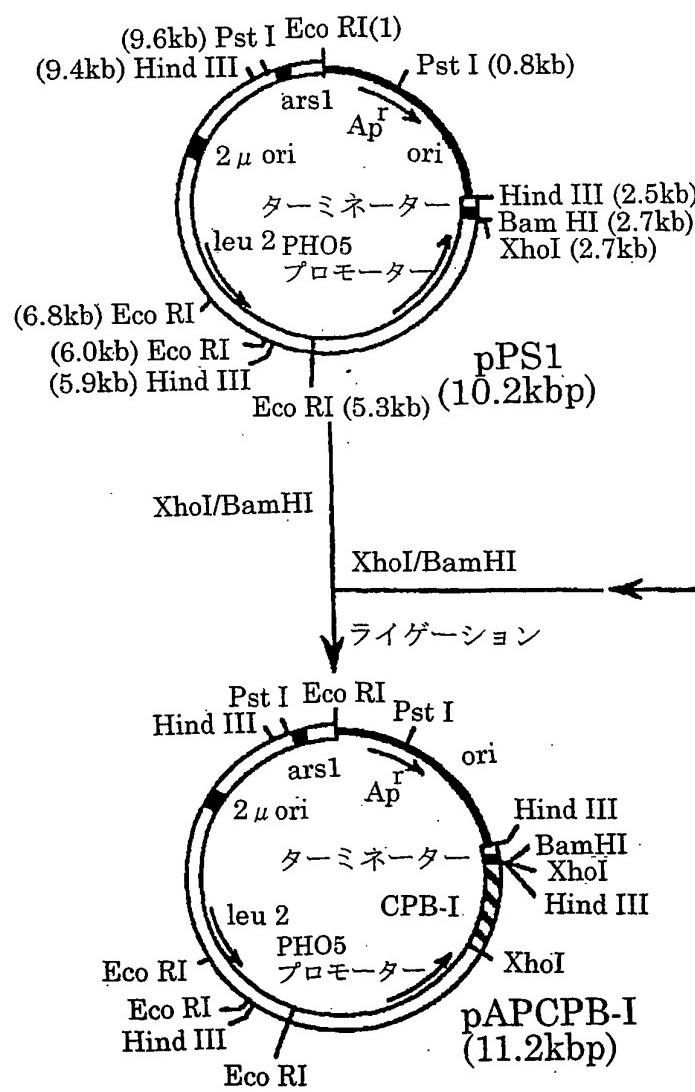
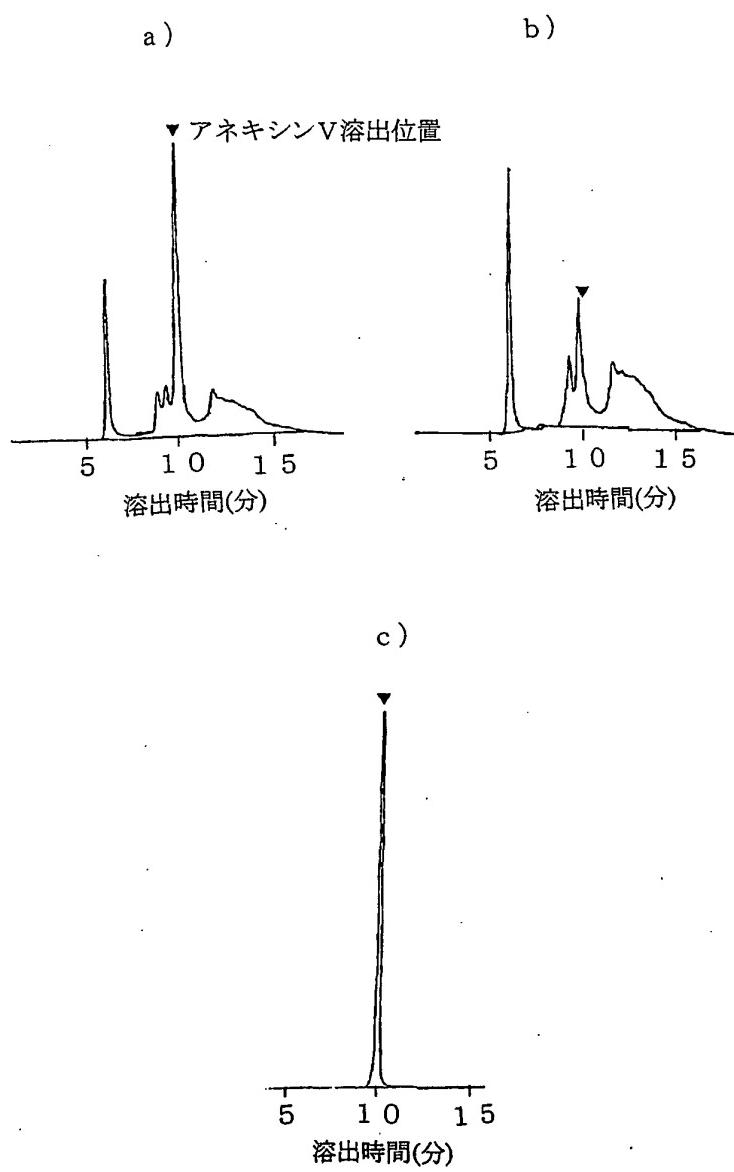


図 1 B



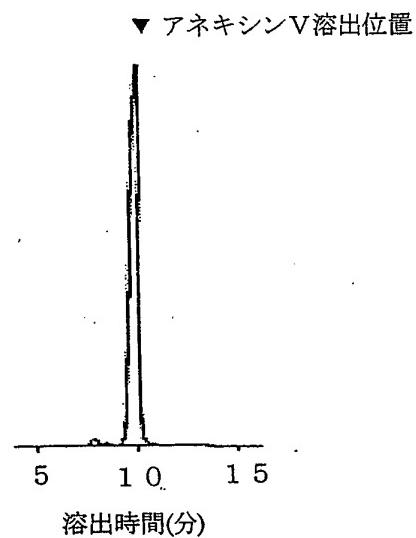
3/8

図 2



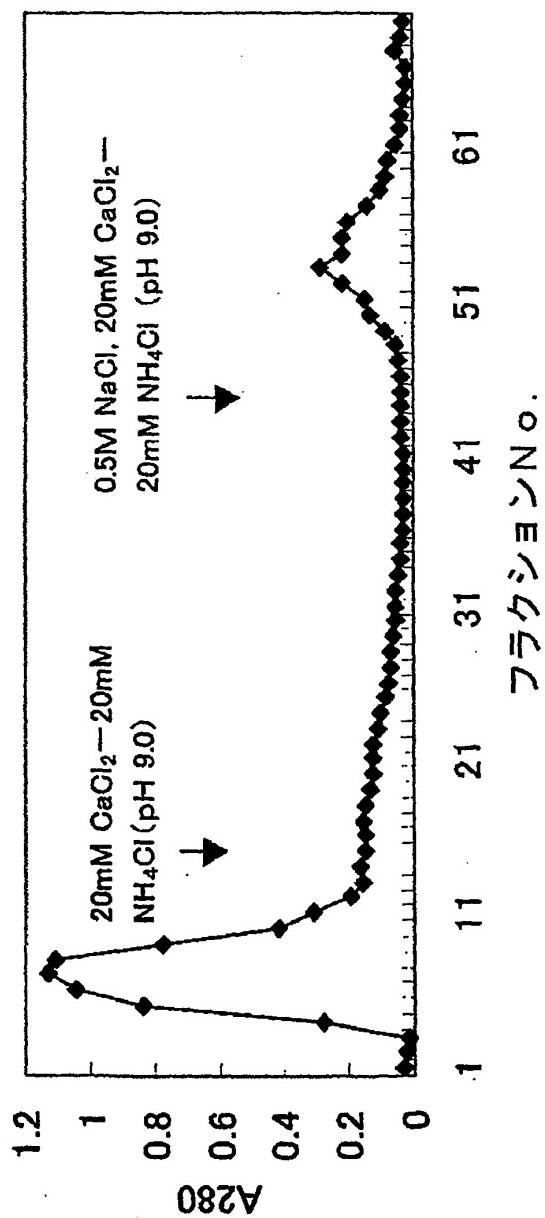
4/8

図 3



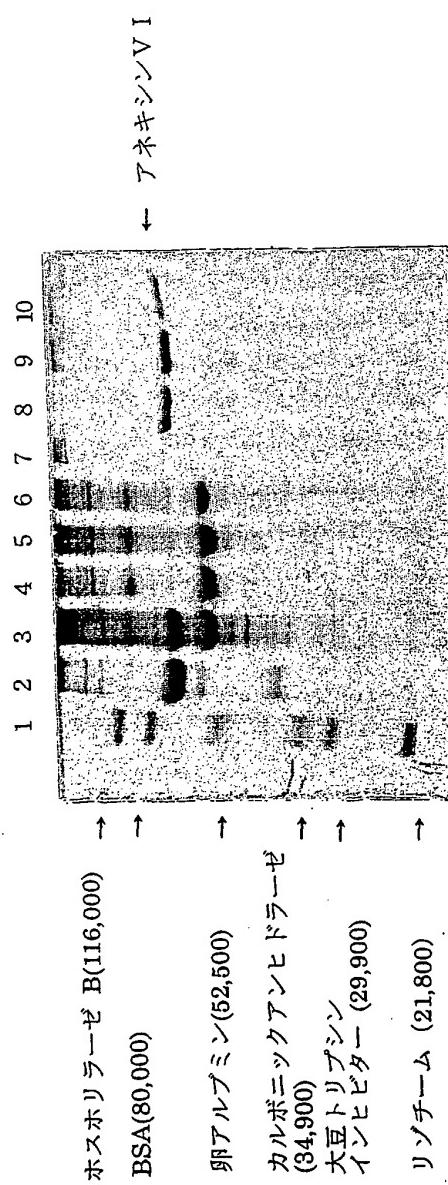
5/8

図 4



6/8

図 5



7/8

図 6

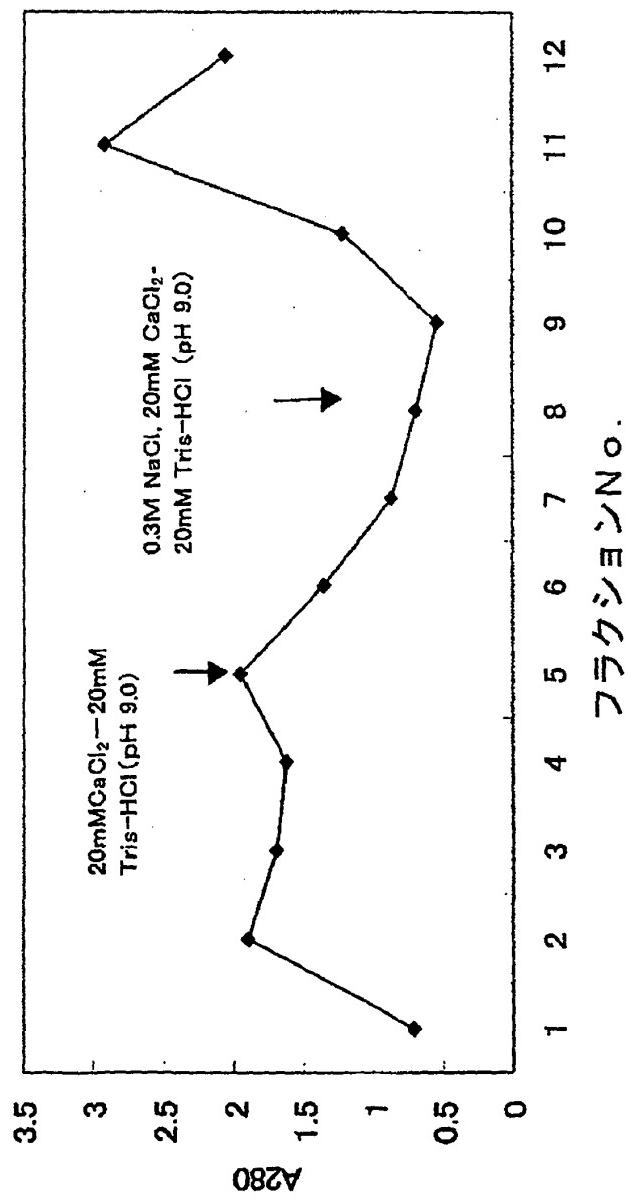


図 7

